N° d'enregistrement
au C.N.R.S. : AO 1865

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant ~~en partie~~

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

Monique PARANT

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

Sujet de la Thèse : **ETUDE DE LA RESISTANCE NON SPECIFIQUE A L'INFECTION**

Soutenue le 6 Février 1968 devant la Commission d'Examen

MM. A. JOST	Président
L. LE MINOR S. JARD L. CHEDID	Examinateurs

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523704_0051

N° d'enregistrement
au C.N.R.S. : AO 1865

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant ~~en partie~~

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

Monique PARANT

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

Sujet de la Thèse : ETUDE DE LA RESISTANCE NON SPECIFIQUE A L'INFECTION

Soutenue **le 6 Février 1968** devant la Commission d'Examen

MM. A. JOST — Président

L. LE MINOR
S. JARD
L. CHEDID — Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

RECHERCHE D'OPSONINES CHEZ LA SOURIS APRÈS STIMULATION PAR L'ENDOTOXINE DE SA RÉSISTANCE A L'INFECTION

PAR

M. PARANT

Imprimé avec le périodique « *Annales de l'Institut Pasteur* ».
(N° d'ordre 4360. — Extrait Août 1968. — Tome **115**. pp. 264-278.)

RECHERCHE D'OPSONINES CHEZ LA SOURIS APRÈS STIMULATION PAR L'ENDOTOXINE DE SA RÉSISTANCE A L'INFECTION (*)

par M. PARANT (**)

(*Service de Chimiothérapie expérimentale, Institut Pasteur, Paris*)

La résistance de l'hôte à différentes infections est augmentée après l'injection d'une faible dose d'une endotoxine bactérienne. Non seulement cette stimulation est très rapide, mais encore elle peut être observée dans certains cas sans qu'il existe d'antigène commun entre l'endotoxine et la souche utilisée pour l'infection. C'est pourquoi ce phénomène a été considéré comme indépendant d'une réponse immunologique, et probablement en rapport avec une stimulation de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial [**25, 26**] ; nous avons d'ailleurs constaté que ce phénomène pouvait être provoqué chez le souriceau quelques heures après la naissance, c'est-à-dire dans des conditions où une formation active d'anticorps paraît exclue. Les nouveau-nés, qu'ils soient conventionnels ou axéniques, répondent comme les adultes à l'injection stimulante [**22**].

On peut opposer à ces arguments que l'administration de l'antigène bactérien à un animal adulte pourrait provoquer rapidement la libération d'anticorps naturels préexistants, par une action directe sur les immunocytes, soit en les lysant, soit en modifiant leur perméabilité [**16, 17, 31**]. Par ailleurs, cette action cytotoxique de l'endotoxine pourrait favoriser la synthèse de nouvelles protéines dans des délais plus courts que ceux d'une réponse immunologique classique. Les produits de dégradation des cellules endommagées seraient capables de stimuler les immunocytes et d'augmenter le nombre de cellules susceptibles de répondre à l'injection d'un antigène même hétérologue. Ces effets pourraient expliquer l'action adjuvante des endotoxines [**3, 29, 12**].

(*) Cet article recouvre en partie le travail d'une thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles présentée devant la Faculté des Sciences de l'Université de Paris et enregistrée au C. N. R. S. sous le numéro A. O 1865.

(**) Manuscrit reçu le 13 janvier 1968.

En effet, d'après Jenkin et Rowley, l'augmentation de l'activité phagocytaire observable après une injection d'endotoxine correspondrait à un accroissement du taux des opsonines [**9, 11**]. De plus, certains auteurs ont remarqué que l'administration d'endotoxine provoquait chez la souris une élévation du taux des anticorps naturels bactéricides. Cette élévation cependant est faible et n'a été obtenue qu'après des doses relativement élevées d'endotoxine (50 μg) et ne dure pas au-delà de dix-huit à vingt-quatre heures [**30, 16**].

Dans nos expériences faites avec une souche de *Klebsiella pneumoniae* très virulente pour la souris, nous avons vu que l'injection préalable d'une très faible dose d'endotoxine augmentait leur résistance indépendamment, semblait-il, de la présence d'anticorps spécifiques [**20**]. C'est ainsi que, contrairement à ce que l'on observe chez des animaux immunisés, les réactions des souris adultes stimulées ne dépendent pas du nombre de bactéries injectées. Par exemple, l'administration préalable d'endotoxine permet d'obtenir une survie de quelques jours avec un inoculum représentant plusieurs milliers de doses mortelles pour la souris, mais la survie est sensiblement du même ordre avec un nombre de bactéries beaucoup plus faible. De même, l'épuration sanguine mesurée avec des germes radioactifs ne varie pas avec la dose injectée [**20, 21, 23**]. Dans ce qui suit, nous avons établi qu'il existait bien une corrélation entre les taux de radioactivité retrouvés et la distribution des bactéries viables. D'autre part, nous n'avons pu mettre en évidence des anticorps circulants chez les souris adultes vingt-quatre heures après une injection d'endotoxine bien qu'à ce moment elles soient résistantes à l'infection par *K. pneumoniae*. Cette recherche a été faite au moyen de tests d'hémagglutination passive, de bactéricidie et d'opsonisation.

TECHNIQUES

Les souris utilisées dans toutes ces expériences sont des mâles Swiss de 20 à 25 g, provenant du centre du C. N. R. S. de Gif-sur-Yvette. L'endotoxine est extraite de *Salmonella enteritidis* par la méthode de Boivin et sa DL_{50} par voie veineuse est d'environ 200 μg pour la souris normale. Les bactéries *Klebsiella pneumoniae* (souche Caroli) proviennent d'une culture de 16 heures en bouillon sérum et sont toujours inoculées par voie intraveineuse.

Les bactéries radioactives sont obtenues par incubation pendant quarante-huit heures à 37° avec du $Na_2{}^{51}CrO_4$ d'une suspension de *K. pneumoniae* tués par chauffage (une heure à 60°), à raison de 1 mCi pour 5×10^{10} germes. Ceux-ci sont ensuite lavés avec du sérum physiologique jusqu'à ce que le surnageant de centrifugation contienne moins de 0,1 p. 100 de la radioactivité fixée. L'activité spécifique obtenue est d'environ 1 μCi pour 10^8 microorganismes. L'épuration sanguine de ces bactéries est évaluée chez la souris selon la technique de Biozzi [**28**]

au moyen de prises de sang répétées au sinus rétro-orbitaire pendant dix à vingt minutes après l'injection. Les animaux sont sacrifiés après trente minutes pour prélever les organes dont la radioactivité est mesurée selon les méthodes décrites précédemment [5].

Pour les numérations de bactéries viables, le sang des souris est prélevé stérilement à l'aorte abdominale sans anticoagulant. Les globules rouges sont lysés en ajoutant 1 ml de sang à 3 ml d'eau distillée avant de diluer les échantillons, toujours maintenus à 4°, dans du sérum physiologique. Les organes sont broyés et dilués avant d'être ensemencés en boîtes de gélose, de manière à compter entre 50 et 500 colonies par boîte de Petri. Dans tous les cas les résultats sont exprimés en tenant compte du volume sanguin total de la souris (soit 7,5 p. 100 du poids du corps) et en soustrayant celui du sang résiduel des organes [5, 23].

Le sérum anti-*Klebsiella* a été préparé chez le lapin avec des bactéries tuées par chauffage à 100° pendant deux heures, à raison de 3 injections intraveineuses par semaine pendant trois semaines, soit 100, 200 et 500 millions la première semaine, puis 1 milliard pour chacune des injections suivantes. Les animaux sont sacrifiés huit jours après la dernière injection. L'immunsérum anti-*Salmonella typhi* O 901 provient d'un cheval immunisé de la même façon.

Les agglutinations sont faites au moyen de globules rouges de mouton formolés et sensibilisés avec le surnageant d'une suspension de bactéries (10^{10}/ml) chauffée pendant une heure à 60°. La sensibilisation se fait en incubant les globules rouges à 10^9/ml avec un volume égal de surnageant pendant deux heures à 37°. Les hématies sont ensuite lavées et les agglutinations sont faites en plaques de plexiglass de type OMS [6].

Pour les expériences de bactéricidie les germes proviennent d'une culture de cinq heures. Dans un volume total de 1 ml, on ajoute à l'inoculum de 10^3 bactéries, le sérum à titrer et une quantité constante de complément (en utilisant comme source de complément du sérum frais de cobaye absorbé au préalable avec 10 p. 100 de germes homologues tués par chauffage). Après une incubation d'une heure à 37°, les suspensions sont diluées et ensemencées en boîtes de gélose. La numération des colonies après une nuit à 37° donne le pourcentage de destruction par rapport aux témoins sans sérum [6, 7].

RÉSULTATS

Dans les expériences suivantes faites avec *K. pneumoniae* chez la souris adulte, l'endotoxine (1 μg) est administrée par voie veineuse vingt-quatre heures auparavant. C'est dans ces conditions, où l'hôte peut résister à un inoculum bactérien représentant plusieurs milliers de fois la dose mortelle [20], que nous avons cherché à mettre en évidence des opsonines spécifiques dans le sérum des animaux. Dans une première étape nous avons établi qu'il existait bien une corrélation entre les taux de radioactivité mesurés après l'injection de *K. pneumoniae* tués et la présence des bactéries.

I. — Comparaison entre l'élimination des germes tués radioactifs et celle des germes vivants

1° Bactéries radioactives.

La vitesse de phagocytose V a été mesurée chez les souris après l'injection à différentes doses de *K. pneumoniae* tués et marqués au ^{51}Cr. La distribution de la radioactivité est mesurée dans les organes

Tableau I. — **Epuration sanguine et distribution de la radioactivité chez la souris après l'injection de *K. pneumoniae* marqués à différentes doses.**

Doses pour 20 g	Traitement (*)	Nombre de souris	Constante V	Pourcentage de radioactivité (**)		
				Sang	Foie	Rate
5×10^6	—	10	—	57,5	15	10,4
	Endotoxine 1 µg	10	—	26,3	40,1	20,6
5×10^7	—	15	0,006	61,3	10,1	12,6
	Endotoxine 1 µg	15	0,028	14,6	54,2	14,1
	Sérum immun 0,03 ml	10	0,183	2,4	82,4	5
	Sérum immun 0,01 ml	10	0,046	14,5	64,6	8,9
	Sérum immun 0,003 ml	10	0,010	42,9	33	10,5
5×10^8	—	14	0,007	57,8	13,2	11,1
	Endotoxine 1 µg	14	0,026	13,8	52,5	13,7
	Sérum immun 0,03 ml	5	0,060	11,7	67,8	5,8
	Sérum immun 0,01 ml	5	0,015	50,2	24,5	10
	Sérum immun 0,003 ml	5	0,007	57,2	18	10,4

(*) Endotoxine 24 heures avant l'expérience, sérum immun 1 heure avant injection I.V.
(**) Taux retrouvés 30 minutes après l'injection des bactéries radioactives.

de ces animaux sacrifiés trente minutes après le début de l'expérience. Les résultats du tableau I ont été obtenus chez des animaux témoins ou chez des animaux qui ont reçu soit 1 µg d'endotoxine vingt-quatre heures auparavant soit différentes doses de sérum spécifique anti-*Klebsiella* une heure avant les bactéries.

On constate qu'après une injection d'endotoxine, l'accélération de la phagocytose est du même ordre quelle que soit l'importance de l'inoculum (5×10^6, 5×10^7 ou 5×10^8 bactéries). Même avec 10^9 *K. pneumoniae*, les pourcentages de radioactivité retrouvés ne varient

pas sensiblement (voir tableau IV). Chez les témoins non traités, l'épuration sanguine des germes est toujours très lente aux différentes doses. Au contraire, chez les animaux qui reçoivent de l'immunsérum, il y a un rapport étroit entre la vitesse de l'élimination et les quantités relatives d'anticorps et d'antigène bactérien, comme c'est la règle dans tous les cas d'opsonisation spécifique [**1, 28**]. Ainsi, pour une dose identique d'immunsérum (0,01 ml), la constante V passe de 0,046 avec 5×10^7 bactéries à 0,015 pour 5×10^8. Pareillement pour un nombre de germes constant, il suffit de diluer le sérum au 1/3 pour que la réponse soit considérablement modifiée.

Dans tous les cas, il existe une bonne corrélation entre l'augmentation de l'épuration sanguine (pente V) et les pourcentages de radioactivités mesurés après trente minutes dans le sang et le foie. En revanche, les taux retrouvés dans la rate ne sont pas toujours plus élevés, l'administration d'anticorps pouvant parfois entraîner un abaissement de la fixation splénique (tableau I).

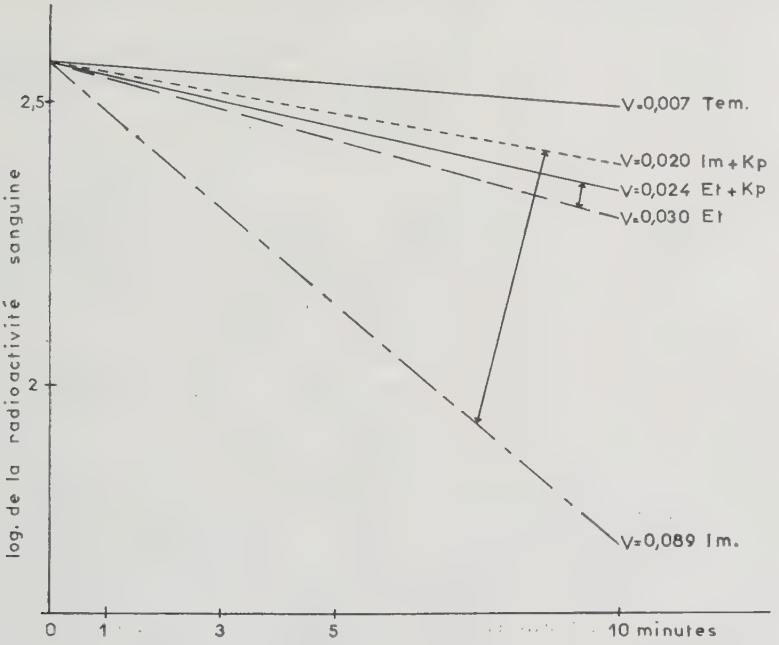
De même que le pouvoir opsonisant de l'immunsérum peut être absorbé *in vitro* par des bactéries homologues, son action sur la phagocytose est inhibée *in vivo* par l'injection de 10^9 germes chauffés. Cependant ce traitement n'influence pas l'élévation de l'index phagocytaire consécutive à une injection d'endotoxine (figure).

Dans cette expérience, 4×10^7 *K. pneumoniae* marqués au ^{51}Cr sont injectés à des lots de cinq souris. Un premier groupe sert de témoins, le second reçoit 0,01 ml d'immunsérum une heure avant l'expérience et le troisième la même dose de sérum suivie d'une injection de 10^9 bactéries chauffées non radioactives. Un μg d'endotoxine est administré la veille aux souris des 2 derniers lots, avec, dans un cas 10^9 germes non marqués une heure avant les *K. pneumoniae* radioactifs. La mesure des épurations sanguines (V) est reportée sur la figure. Ces résultats montrent que l'injection simultanée de bactéries homologues diminue nettement la vitesse de l'épuration sanguine des germes marqués chez les souris qui reçoivent du sérum immun, tandis que l'élimination n'est pas modifiée dans le groupe stimulé par l'endotoxine (la différence entre 0,024 et 0,030 n'est pas statistiquement significative).

2° Numérations de bactéries viables.

L'utilisation des germes vivants permet de s'assurer que la distribution de la radioactivité évaluée dans les expériences précédentes correspond bien à celle des bactéries. De plus, il est possible par ce moyen de mesurer la vitesse d'élimination d'un nombre de germes beaucoup plus faible. Les numérations du tableau II ont été faites trente minutes après l'injection de *K. pneumoniae* par voie veineuse à la souris.

A partir du nombre de bactéries isolées dans le sang, le foie et la rate, les quantités totales sont évaluées en tenant compte des volumes sanguins comme dans les expériences précédentes. Cependant, les pourcentages sont calculés non plus d'après la dose injectée, mais d'après le nombre total de germes retrouvés à cause de la multiplication ou de la destruction possible de ces bactéries. Ces



Effet d'une injection de bactéries homologues sur la vitesse de phagocytose V chez des souris immunisées ou stimulées par l'endotoxine et recevant 4 × 10^7 *K. pneumoniae* radioactifs.

Tem = témoins, Et = endotoxine, Im = sérum immun 1/100 ml, Kp = 10_8 *K. pneumoniae* chauffés non radioactifs.

résultats montrent qu'il y a effectivement une très bonne corrélation entre les taux de radioactivité (voir tableau I) et la distribution des germes viables. La quantité totale de bactéries retrouvées dans le sang, le foie et la rate chez les animaux stimulés par l'endotoxine est légèrement inférieure à l'inoculum tandis qu'on peut noter une faible augmentation chez les témoins. Les pourcentages évalués après l'injection de 1,5 × 10^7 germes vivants sont en tout cas très voisins de ceux du tableau I obtenus avec un nombre comparable de bactéries radioactives.

Des numérations de bactéries viables ont également été faites après l'injection de doses plus faibles de *K. pneumoniae*. On voit ainsi sur le tableau II que la distribution est sensiblement la même avec un inoculum passant de 10^2 à 10^7 bactéries. Par conséquent, bien que les souris stimulées par l'endotoxine soient capables de phagocyter 50 p. 100 de 10^7 germes en trente minutes, elles ne peuvent pas en détruire complètement 500 dans le même temps.

TABLEAU II. — **Numérations de *K. pneumoniae* viables trente minutes après l'injection chez des souris normales ou traitées avec l'endotoxine.**

TRAITEMENT (*)	NOMBRE DE SOURIS	INOCULUM	NOMBRE DE BACTÉRIES RETROUVÉES (**)			
			Total	Sang %	Foie %	Rate %
—	10	5×10^2	$5{,}2 \times 10^2$	76	14,2	9,8
Endotoxine	10	5×10^2	$4{,}1 \times 10^2$	47	31	22
—	10	10^5	$1{,}1 \times 10^5$	71,4	16,4	12,2
Endotoxine	10	10^5	$9{,}3 \times 10^4$	37,3	39,4	23,3
—	5	$1{,}5 \times 10^7$	$1{,}7 \times 10^7$	70,2	15,4	14,4
Endotoxine	5	$1{,}5 \times 10^7$	$1{,}2 \times 10^7$	27,4	48	24,6

(*) Endotoxine 1 µg en injection I.V. 24 heures avant celle des bactéries.
(**) 30 minutes après l'inoculation de *K. pheumoniae* par voie veineuse.

Ces expériences établissent la concordance entre les mesures de radioactivité et les numérations de bactéries. Dans les 2 cas, il n'y a pas de rapport chez les souris stimulées par l'endotoxine entre le nombre de germes inoculés et leur vitesse d'élimination. Dans les expériences qui suivent, nous avons cherché à mettre en évidence directement des anticorps circulants chez la souris après une injection d'endotoxine.

II. — RECHERCHE D'OPSONINES CHEZ LA SOURIS STIMULÉE PAR L'ENDOTOXINE

1° HÉMAGGLUTINATION ET BACTÉRICIDIE.

a) *Expériences faites avec* K. pneumoniae. — Les globules rouges de mouton sensibilisés avec le surnageant d'une suspension de *K. pneumoniae* sont agglutinés par l'immunsérum déjà utilisé dans les expériences précédentes, à la dilution de 1/1 600. En revanche, le sérum de souris normale ou stimulée par l'endotoxine n'a aucun pouvoir agglutinant (tableau III). Ces sérums de souris même

employés purs, n'exercent par ailleurs aucune action lytique vis-à-vis de ces bactéries en présence de complément.

Il faut remarquer cependant que même le sérum immun préparé chez le lapin est pratiquement dépourvu de pouvoir bactéricide (tableau III). Au contraire, avec des bactéries très sensibles à la lyse par le système anticorps-complément, la dilution d'immunsérum capable de tuer 50 p. 100 de l'inoculum bactérien est généralement proche du titre minimal agglutinant. C'est le cas notamment pour la souche de *Salmonella typhi* O 901 utilisée dans les expériences suivantes (voir tableau III).

b) *Expériences faites avec* S. typhi *O 901.* — Bien que le sérum de souris normale n'agglutine pas les globules rouges sensibilisés avec

Tableau III. — **Hémagglutination passive et activité bactéricide du sérum de souris vis-à-vis de *K. pneumoniae* et *S. typhi* O 901.**

Sérums	*K. pneumoniae*		*S. typhi* o 901	
	Hémagglutination (***)	Bactéricidie (*)	Hémagglutination (***)	Bactéricidie (*)
Sérum de souris normale.....	nég. pur	nég. pur	nég. pur	1/600
Sérum de souris traitée (**)..	nég. pur	nég. pur	nég. pur	1/600
Immunsérum spécifique	1/1600	1/10	1/50 000	1/50 000

(*) Dilution du sérum correspondant à la DL_{50}.
(**) Souris ayant reçu 1 µg d'endotoxine I.V. 24 heures auparavant.
(***) Dilution minimale agglutinante.

le surnageant d'une suspension de *S. typhi* O 901, il est néanmoins bactéricide pour ces germes. L'action lytique du sérum a été mesurée vingt-quatre heures après l'injection de 1 µg d'endotoxine à la souris pour voir si ce traitement modifiait cette activité.

Les résultats groupés dans le tableau III sont les moyennes de plusieurs expériences et sont exprimés par la dilution minimale de sérum capable de tuer 50 p. 100 des bactéries. On voit sur le tableau que le pouvoir bactéricide n'est pas augmenté chez les animaux qui ont reçu l'endotoxine. Rappelons que le titre du sérum de souris normale (1/600) correspond à ce qui a généralement été trouvé par d'autres auteurs.

Nous avons vu plus haut que le sérum de souris stimulée ne possédait ni agglutinines ni bactéricidines pour *K. pneumoniae.* Mais on

sait que les anticorps ne donnent pas nécessairement une réponse positive avec tous les tests utilisés en sérologie [2]. Aussi dans les expériences qui suivent avons-nous cherché à mettre directement en évidence des opsonines spécifiques pour ces germes. Cette étude a été faite en mesurant *in vivo* la vitesse de la phagocytose par des bactéries radioactives incubées au préalable avec le sérum [1].

2° Pouvoir opsonisant vis-a-vis de *K. pneumoniae* du sérum de souris immunisée ou traitée avec l'endotoxine.

Chez la souris stimulée par l'endotoxine, l'épuration sanguine de 5×10^9 *K. pneumoniae* est quatre à cinq fois plus rapide que chez les témoins (voir tableau IV). Avec ce même nombre de germes, nous

Tableau IV. — **Epuration sanguine et distribution de la radioactivité après l'injection de 5×10^9 *K. pneumoniae* marqués au ^{51}Cr chez la souris traitée avec l'endotoxine ou recevant du sérum immun.**

Traitement (*)		Constante V	Pourcentage de radioactivité (**)	
			Sang	Foie
—		0,003 ± 0,0012 (***)	64,7	7,1
Endotoxine	1 µg	0,014 ± 0,0022	35,4	34,7
Sérum immun	0,03 ml	0,139 ± 0,008	6	62,5
	0,01 ml	0,012 ± 0,0023	46,1	26,8
	0,003 ml	0,009 ± 0,0028	49,9	21
	0,001 ml	0,007 ± 0,002	52,2	19,4

(*) Endotoxine 24 heures auparavant et immunsérum 1 heure avant les bactéries.
(**) Taux retrouvés 30 minutes après l'injection des bactéries marquées, moyennes pour des lots de 10 souris.
(***) Déviation standard.

avons évalué la dose d'immunsérum spécifique nécessaire pour obtenir chez une souris normale un effet comparable. Les expériences du tableau IV montrent que cette dose se situe aux environs de 0,01 ml de sérum injecté une heure auparavant.

Il est possible d'obtenir une réponse semblable avec un taux d'opsonines plus faible à condition de diminuer le nombre des bactéries (voir tableau I). De plus, l'effet de l'immunsérum est augmenté d'environ dix fois s'il est incubé avec les germes avant

l'injection à la souris. Ainsi pour 5×10^7 *K. pneumoniae,* la constante V est de 0,036 si les bactéries ont été incubées avec 0,001 ml de sérum immun, tandis qu'il faut injecter 0,01 ml de ce sérum pour obtenir une vitesse d'épuration comparable (0,046). Avec cette méthode, il est possible d'évaluer les taux d'anticorps circulants chez une souris qui a été immunisée passivement avec 0,01 ml d'immun-sérum une heure auparavant. Dans les expériences qui suivent, les

Tableau V. — **Epuration sanguine et distribution de la radioactivité chez la souris après l'injection de 5×10^7 *K. pneumoniae* marqués et incubés dans du sérum de souris traitée avec l'endotoxine ou ayant reçu du sérum immun.**

Incubation préalable des bactéries (*)	Traitement des receveurs	Constante V	Pourcentage de radio-activité (**)	
			Sang	Foie
—	—	0,005 ± 0,0018 (**)	62,3	4,5
—	Endotoxine	0,017 ± 0,0026	21,9	41,9
Sérum souris normale.	—	0,005 ± 0,0015	62,5	5,1
Sérum souris traitée..	—	0,005 ± 0,0010	59,4	7,6
Sérum souris immunisée : au 1/3	—	0,380 ± 0,009	1,2	86,3
Sérum souris immunisée : au 1/10	—	0,028 ± 0,005	15,9	55,7

(*) Incubation 30 mn à 4° dans le sérum pur de souris normale ou traitée avec 1 µg d'endotoxine la veille, ou dans le sérum dilué de souris qui ont reçu 0,01 ml de sérum immun 1 heure auparavant.
(**) Taux retrouvés 30 mn après l'injection des bactéries, moyennes pour des lots de 10 souris.
(***) Déviation standard.

bactéries sont incubées dans le sérum de souris à 4° pendant trente minutes, de façon à injecter à des receveurs normaux 5×10^7 *K. pneumoniae* dans un volume de 0,2 ml (tableau V).

L'épuration sanguine des bactéries incubées dans le sérum des souris immunisées passivement est très rapide, même si ce sérum a été dilué au 1/10 avant l'incubation. Les résultats du tableau V montrent qu'en comparaison le sérum des souris stimulées par l'endotoxine ne possède aucun pouvoir opsonisant pour ces germes. La constante V est identique à celle que l'on obtient avec du sérum de souris normale ou même avec du sérum physiologique. Avec cette méthode très sensible il ne nous a donc pas été possible de mettre en évidence des opsonines transférables dans le sérum de ces souris capables d'éliminer rapidement du sang 5×10^9 *K. pneumoniae.*

DISCUSSION

L'augmentation de la résistance de l'hôte aux infections ou à l'action létale de l'endotoxine, consécutive à une première injection de cet antigène, semble liée dans certains cas à une élévation du taux d'anticorps circulants. Ainsi, chez le lapin rendu résistant par plusieurs injections d'endotoxine, le pouvoir bactéricide du sérum augmente et la protection peut être transférée passivement à un autre animal par la fraction sérique contenant les immunoglobulines de la classe des 19S [**30, 14, 13**].

Chez la souris, des facteurs sériques possédant une action lytique ont été mis en évidence pour un nombre limité de bactéries Gram-négatives. Cette activité bactéricide doit être attribuée à la présence d'anticorps naturels absorbables par les organismes testés plutôt qu'à un facteur non spécifique comme les premiers travaux sur la properdine pouvaient le faire penser [**24, 18, 19**]. Après l'administration d'une forte dose d'endotoxine à la souris, ce pouvoir bactéricide du sérum peut être accrû [**31, 16**]. Cependant, il n'existe pas nécessairement de corrélation entre l'augmentation de la résistance et l'élévation du taux des anticorps naturels. Ainsi par exemple, des injections répétées d'endotoxine entraînent un accroissement de la résistance des souris à l'infection bien que dans ces conditions l'antigène n'ait plus d'action sur le taux d'anticorps naturels [**4**]. De même, durant la paralysie immunitaire provoquée chez la souris par l'administration d'une dose massive de polysaccharide de pneumocoque, l'injection préalable d'endotoxine peut protéger les animaux contre une infection à pneumocoque [**15**].

Pour certains auteurs, la phagocytose par le système réticulo-endothélial dépend d'ailleurs essentiellement de la présence de facteurs sériques. L'augmentation de l'activité phagocytaire serait liée à l'élévation du taux des opsonines spécifiques. De même le blocage de cette activité correspondrait à un épuisement de ces anticorps qui ne possèdent pas nécessairement une action bactéricide [**9, 11**]. Notons cependant que d'autres auteurs, utilisant des méthodes différentes, n'ont pas confirmé ces résultats [**1, 8**].

Dans nos expériences nous avons vu que l'injection de 1 μg d'endotoxine la veille de l'infection accélérait la vitesse de l'épuration sanguine et permettait simultanément la destruction dans le compartiment hépatique de bactéries très virulentes comme *K. pneumoniae* [**20**]. Les résultats que nous présentons ici montrent que cette faible dose d'endotoxine n'a pas augmenté l'activité bactéricide du sérum de souris ou son pouvoir hémagglutinant vis-à-vis de *K. pneumoniae*. Dans ces mêmes conditions, il n'a pas été possible de déceler d'opsonines circulantes chez les animaux stimulés.

De plus, comme l'ont signalé Biozzi et coll. [28] avec certaines souches de salmonelles, il n'y a pas chez la souris normale de corrélation entre le nombre de *Klebsiella* inoculés et la vitesse d'élimination. C'est une des raisons pour lesquelles on utilise la constante V au lieu de l'index K réservé pour les suspensions colloïdales [28]. En outre, chez les souris stimulées par l'endotoxine, il n'existe pas de rapport entre l'augmentation de l'épuration sanguine et le nombre de bactéries injectées, contrairement à ce que l'on observe dans les cas d'opsonisation spécifique [1]. Nous l'avons vérifié avec *K. pneumoniae* chez des souris immunisées passivement ou par l'incubation préalable des bactéries avec les anticorps spécifiques.

Comment expliquer alors l'augmentation de la phagocytose consécutive à l'injection d'endotoxine ? On sait que l'épuration sanguine des souches non virulentes est très rapide [11]. D'autre part, la perte de virulence peut être obtenue en traitant au préalable par des enzymes les parois des bactéries comme par exemple des streptocoques, des brucelles ou des klebsielles (voir [23]). Dans ce dernier cas l'enzyme utilisée par Adams et Park provient d'un phage, il attaque le polysaccharide de surface et diminue la virulence de la bactérie sans affecter sa viabilité *in vitro*. Des expériences de transfert de bactéries nous ont montré que les *K. pneumoniae* retrouvés dans le compartiment hépatique d'un animal préalablement stimulé avaient subi une modification phénotypique facilitant leur ingestion par les cellules réticulo-endothéliales normales. Cette altération peut être liée à une attaque des constituants de la paroi bactérienne [23]. D'ailleurs on sait que l'animal stimulé par une première injection d'endotoxine est capable de dégrader l'antigène somatique, c'est-à-dire un antigène de paroi [27]. Le processus serait suffisamment augmenté par l'administration préalable d'endotoxine pour permettre à l'hôte d'éliminer rapidement des bactéries virulentes. La probabilité de rencontre entre un nombre donné de cellules fixes (cellules de Küppfer) et les germes ainsi modifiés dépendrait strictement de la concentration sanguine de ces derniers. En d'autres termes, on observerait le même pourcentage de phagocytose dans un temps donné quel que soit le nombre de *Klebsiella* inoculés. Ceci expliquerait le fait que chez un animal rendu résistant, il n'y ait pas de rapport entre la vitesse d'épuration sanguine et l'importance de l'inoculum.

RÉSUMÉ

L'action protectrice de l'endotoxine vis-à-vis d'une infection à *Klebsiella pneumoniae* ne dépend pas, chez la souris, de la présence d'opsonines spécifiques. En effet, la vitesse d'élimination des bactéries vivantes ou tuées et radioactives qui est très augmentée chez les souris stimulées par l'endotoxine, ne varie pas en fonction de l'im-

portance de l'inoculum, comme on peut le voir chez les animaux immunisés. De plus, dans les conditions de nos expériences, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'anticorps anti-*Klebsiella* dans le sérum de ces souris par des tests de bactéricidie, d'hémagglutination ou d'opsonisation.

SUMMARY

Endotoxin-induced resistance to *Klebsiella pneumoniae* infection is unrelated to the presence of specific opsonins. Indeed the blood clearance of viable or heated radioactive microorganisms, although very increased in endotoxin-treated mice, is independent of the number of microorganisms, contrarily to what is observed by using passively immunized animals. Moreover the presence of *Klebsiella* antibody was investigated by using bactericidal, passive hemagglutination and opsonization tests. In our experimental conditions, no differences were detected between normal and endotoxin-treated mice sera.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Biozzi (G.) et Stiffel (C.). Etude du rôle des opsonines dans le phénomène de phagocytose des microorganismes et des colloïdes par les cellules du S. R. E. In *Rôle du S. R. E. dans l'immunité antibactérienne et antitumorale.* Coll. C. N. R. S., 1963, 261-289.

[2] Boyden (S. V.). Natural antibodies and the immune response. *Advances in Immunology,* 1966, **5**, 1-28.

[3] Braun (W.) and Kessel (R. W. I.). Cytotoxicity of endotoxins in relation to their effects on host resistance. In *Bacterial Endotoxins,* Rutgers univ., New Brunswick, N. J., 1964, 397-409.

[4] Braun (W.), Nakano (M.) and Freedman (H.). On the role of antigen in the stimulation of multiplication of antibody-forming cells, *Fed. Proc.,* 1966, **25**, 370.

[5] Chedid (L.) et Parant (M.). Etude de la tolérance de la souris surrénalectomisée au moyen d'une endotoxine marquée avec du ^{51}Cr. *Ann. Inst. Pasteur,* 1961, **101**, 170-177.

[6] Chedid (L.), Parant (M.), Parant (F.) and Boyer (F.). A proposed mechanism for natural immunity to enterobacterial pathogens. *J. Immunol.,* 1968, **100**, 292-301.

[7] Chedid (L.), Parant (M.), Parant (F.) et Boyer (F.). Rôle des anticorps « R » dans l'immunité naturelle aux entérobactéries. In *Structure et effets biologiques de produits bactériens provenant de bacilles Gram-négatifs.* Coll. C. N. R. S., 1967, sous presse.

[8] Cooper (G. N.) and Stuart (A. E.). Susceptibility of mice to pneumococcal infection after modification of the reticulo-endothelial system with simple lipids. *J. Path. Bact.,* 1962, **83**, 227-243.

[9] Jenkin (C. R.). The effect of opsonins in the intracellular survival of bacteria. *Brit. J. exp. Path.,* 1963, **44**, 47-57.

[10] Jenkin (C. R.) and Rowley (D.). Opsonins as determinants of survival in intraperitoneal infections of mice. *Nature*, 1959, **184**, 474-475.

[11] Jenkin (C. R.) and Rowley (D.). The role of opsonins in the clearance of living and inert particles by cells of the reticuloendothelial system. *J. exp. Med.*, 1961, **114**, 363-374.

[12] Johnson (A. G.), Gaines (S.) and Landy (M.). Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa*. *J. exp. Med.*, 1956, **103**, 225-246.

[13] Kim (Y. B.) and Watson (A. D.). Passive transfer of pyrogenic tolerance to bacterial endotoxins with fractions containing 19S antibodies. *Bact. Proc.*, 1964, 44.

[14] Landy (M.) and Weidantz (W. P.). Natural antibodies against Gram-negative bacteria. In *Bacterial Endotoxins*, Rutgers univ., New Brunswick, N. J., 1964, 275-290.

[15] Margherita (S. S.) and Friedman (H.). Induction of nonspecific resistance by endotoxin in unresponsive mice. *J. Bact.*, 1965, **89**, 277-280.

[16] Michael (J. G.). The release of specific bactericidal antibodies by endotoxin. *J. exp. Med.*, 1966,, **123**, 205-212.

[17] Michael (J. G.), Whitby (J. L.) and Landy (M.). Increase in specific bactericidal antibodies after administration of endotoxin. *Nature*, 1961, **191**, 296-297.

[18] Nelson (R. A.). An alternative mechanism for the properdin system. *J. exp. Med.*, 1958, **108**, 515-535.

[19] Osawa (E.) and Muschel (L. H.). The bactericidal action of normal serum and the properdin system. *J. Immunol.*, 1961, **84**, 203-212.

[20] Parant (M.), Boyer (F.) et Chedid (L.). Augmentation de la résistance aux infections, consécutive à une injection d'entotoxine. Mise en évidence du mécanisme par l'association de sulfamide. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1965, **260**, 2630-2633.

[21] Parant (M.), Boyer (F.) et Chedid (L.). Augmentation de la résistance aux infections, consécutive à une injection d'endotoxine. — II. Rôle de l'hypophyse et de la surrénale. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1965, **260**, 3218-3221.

[22] Parant (M.) et Sacquet (E.). Augmentation de la résistance à l'infection du souriceau conventionnel ou axénique après une injection d'endotoxine. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1966, **262**, 1914-1917.

[23] Parant (M.), Parant (F.), Boyer (F.) and Chedid (L.). On the nature of some nonspecific host responses in endotoxin-induced resistance to infection. In *the Reticuloendothelial system and Atherosclerosis*. Plenum Press, 1967, 275-284.

[24] Pillemer (L.). The nature of the properdin system and its interactions with polysaccharide complexes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1956, **66**, 233-243.

[25] Rowley (D.). Endotoxin-induced changes in susceptibility to infections. In *Bacterial Endotoxins*. Rutgers univ. New Brunswick, N. J., 1964, 359-372.

[26] Shilo (M.). Nonspecific resistance to infections. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1959. **13**, 255-278.

[27] Skarnes (R. C.) and Chedid (L.). Biological degradation and inactivation of endotoxin. In *Bacterial Endotoxins*, Rutgers univ., New Brunswick., N. J., 1964, 575-587.

[28] Stiffel (C.), Biozzi (G.), Mouton (D.), Bouthillier (Y.) et Decreusefond (C.). Opsonines naturelles et phagocytose des bactéries par le système réticulo-endothélial. *J. Re. Soc.*, 1964, **1**, 265-276.

[29] Taliaferro (W. H.) and Jaroslaw (B. N.). Factors associated with initiation of the immune response. *J. inf. Dis.*, 1960, **107**, 56-64.

[30] Weidanz (W. P.) and Landy (M.). A simplified method for bactericidal assay of natural antibodies against Gram-negative bacteria. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1963, **113**, 861-867.

[31] Whitby (J. L.), Michael (J. G.), Woods (M. W.) and Landy (M.). Possible mechanisms whereby endotoxins evoke increased nonspecific resistance to infection. *Bact. Rev.*, 1961, **25**, 437-449.

Imprimé par l'Ancienne Imprimerie de la Cour d'Appel. 1, rue Cassette à Paris (France).
Printed in France. (71337)